ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

УДК 535.71

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И ГЛУТАТИОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, МОДЕЛИРУЮЩЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

© 2021 г. Н. Ю. Герасимов^{1*}, Г. Ф. Иваненко^{1**}, Н. В. Бобкова², О. В. Неврова¹, А. Н. Голощапов¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия ²Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

*E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com **E-mail: galiv03@rambler.ru Поступила в редакцию 02.07.2020; после доработки 02.07.2020; принята в печать 21.09.2020

На мышах линии NMR1 при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа в разные сроки после операции: от двух недель до 12 месяцев, наблюдали изменение микровязкости липидной и белковой областей мембран, параметров перекисного окисления липидов эритроцитов по уровню малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и окислительно-восстановительного состояния системы глутатиона в плазме крови. Обнаружено, что индукция значительных уровней перекисного окисления липидов, измеренных как увеличение содержания МДА, происходила только после значительного истощения уровня восстановленного глутатиона (GSH), увеличения окисленного глутатиона (GSSG) и снижения тиодисульфидного отношения ([GSH]/[GSSG]) в плазме крови мышей с увеличением возраста животных при проявлении признаков, сходных с признаками болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: текучесть и структура мембраны, эритроциты, восстановленный и окисленный глутатион, плазма крови, экспериментальная патология, болезнь Альцгеймера. **DOI:** 10.31857/S0207401X21020059

введение

Одной из важных проблем в настоящее время являются деменции альцгеймеровского типа. Несмотря на то, что прикладываются значительные усилия для исследования данной патологии и уже известны многие детали при ее развитии, механизм развития болезни Альцгеймера (БА) до сих пор неизвестен. При разработке подходов к созданию модели спорадической формы болезни Альцгеймера на животных проводили двустороннее удаление обонятельных луковиц (бульбэктомия) для инициации распространяющегося процесса дегенерации в специфических структурах мозга. У бульбэктомированных (БЭ) животных в мозге возрастает содержание β-амилоидных пептидов (βА) в период наиболее выраженного нарушения пространственной памяти. Отмечается гибель нейронов в структурах мозга, связанных с памятью. Такие нарушения в модельных экспериментах на животных являются характерными признаками развития

нейродегенеративного процесса по типу болезни Альцгеймера у человека [1, 2].

Как известно, болезнь Альцгеймера характеризуется на гистологическом уровне так называемыми нейродегенеративными бляшками и нейрофибриллярными клубками, которые формируются в нейронах и состоят из гиперфосфорилированной формы внутриклеточного тау-белка. Внеклеточное отложение βА вызывает местные воспалительные процессы [3].

В отличие от амилоидных бляшек βА-воспаление коррелирует с потерей нейронов и снижением когнитивных функций при БА. Это позволяет предположить, что оно играет важную роль в прогрессировании заболевания. Накопление активных форм кислорода при БА может быть вызвано митохондриальной дисфункцией, приводящей к дефекту дыхательной цепи и, как следствие, к образованию избытка свободных радикалов кислорода и накоплению внеклеточного β-амилоида. Отложение βA вызывает местные воспалительные процессы и активирует микроглию, которая является еще одним потенциальным источником реакционных радикалов кислорода [4, 5].

Массивный синтез свободных радикалов увеличивается в процессе клеточного старения, когда происходят нарушения функции и целостности митохондриальной мембраны. При этом структура мембраны, а также ее липидные свойства очень восприимчивы к перекисному окислению липидов [6].

Важную роль в передаче, переработке и хранении информации в клетке играет липидная компонента мембран. Состояние липидной компоненты биологических мембран определяется рядом параметров: микровязкостью липидов, фосфолипидным и жирнокислотным составом, процессами пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Возможно, ПОЛ является определяющим фактором в состоянии липидного бислоя, так как оно связано с другими характеристиками мембранных липидов [7].

При изучении структурного состояния мембран эритроцитов у людей с болезнью Альцгеймера, где в качестве структурных характеристик использовали гемолиз эритроцитов и содержание молонового диальдегида (МДА) как показатель ПОЛ, а также микровязкость липидного бислоя, обнаружено, что у всех пациентов с БА повышена текучесть обеих областей (липидной и прибелковой) мембраны эритроцитов [8]. На начальной стадии развития экспериментальной патологии, моделирующей БА у мышей, обнаружено снижение микровязкости мембран, выделенных из мозга [9].

Накапливающиеся доказательства подтверждают гипотезу о том, что окислительный стресс и ПОЛ играют важную роль в большинстве нейродегенеративных заболеваний, связанных с возрастом. Окислительный стресс при болезни Альцгеймера является ранним событием и возникает до проявления цитопатологических признаков. Поэтому считается, что окислительный стресс может играть ключевую патогенную роль при болезни.

Действительно, гибель клеток и другие нарушения при БА связаны с окислительным стрессом и оксидативными повреждениями. Мозг особенно уязвим к окислительному стрессу из-за высокого потребления кислорода, недостатка антиоксидантов по сравнению с другими органами и большого содержания липидов [10].

В клетке существует несколько сбалансированных систем, определяющих антиоксидантный статус организма, которые можно рассматривать как регуляторные. Значительное место среди них занимают как ферменты, так и природные антиоксиданты – ингибиторы процессов свободнорадикального окисления. Другие антиоксидантные механизмы зависят в значительной степени от серосодержащих аминокислот (цистеина и метионина) в белках и небелковых кофакторах, особенно от цистеинсодержащего трипептида — восстановленного глутатиона (GSH), который находится в изобилии внутри клеток [11].

Обсуждается значение редокс-дисбаланса тиолов как фактора, способствующего нейродегенеративным заболеваниям. Биологическая активность атома серы в цистеине, находящемся в виде свободной или включенной в белки и пептиды аминокислоты, является важным фактором при окислительном повреждении, эксайтотоксичности и нейродегенерации. Восстановление окислительно-восстановительного баланса важно для минимизации потери нейронов во время нейродегенерации [12].

Глутатион является одним из основных компонентов системы антиоксидантной защиты клеток млекопитающих. Он обладает множественными антиоксидантными свойствами, которые включают в себя прямое конъюгирование со свободными радикалами, ферментативную нейтрализацию свободных радикалов и регенерацию других жирорастворимых антиоксидантов, таких как витамины С и Е [13]. Глутатион снижает процессы перекисного окисления липидов, напрямую блокируя деятельность реакционных форм кислорода [14, 15]. Чрезмерная генерация последних приводит к окислительному стрессу, вызывающему нарушение гомеостаза GSH и снижение активности глютатионзависимых ферментов. [12, 16].

Несмотря на исключительность синтеза глутатиона в цитозоле, он обнаруживается во внутриклеточных пулах: в цитоплазме, ядре, митохондриях, и равномерно распределяется во внутриклеточных органеллах, чтобы контролировать по необходимости специфические отделы и функции. Внутриклеточный глутатион преимущественно находится в восстановленной форме, за исключением эндоплазматического ретикулума, где он существует в основном в окисленной форме (GSSG). Окисленный глутатион - главный источник окислительного эквивалента для обеспечения соответствующего окружения, необходимого для образования дисульфидных связей в белках. Истощение уровня митохондриального уровня GSH повышает чувствительность клеток к окислительному стрессу, такому как фактор некроза опухоли, гипоксии, β-амилоиду, что способствует патогенетическим заболеваниям [17, 18].

Принимая во внимание существенные доказательства, подтверждающие наличие повышенного окислительного стресса при развитии нейродегенеративных заболеваний, можно утверждать, что создание биомаркеров для выявления деменции в доклинический период позволит понять суть заболеваний не только на ранних стадиях, но и при максимальных проявлениях БА. В основу экспериментальной модели спорадической формы болезни Альцгеймера была положена гипотеза о роли нарушений обонятельной системы при развитии данной патологии [1].

Целями наших исследований были изучение структурных характеристик мембран эритроцитов и анализ системы глутатиона в плазме крови мышей при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа на основе бульбэктомии, в сравнении с ложной операцией в сроки от двух недель до 12 месяцев после операции и контрольной группой мышей до операции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на мышах-самках линии NMRI [19] до операции (количество животных n = 19) и после двустороннего удаления обонятельных луковиц (n = 10) путем аспирации через трепанационное отверстие (бульбэктомия). Ложнооперированные (ЛО) животные (n = 9) подвергались аналогичной манипуляции, но без удаления обонятельных структур.

Кровь (0.2 мл), взятую из глазной вены индивидуально от каждого животного, помещали в цитратный раствор (0.4 мл) до и через 2 недели, 1, 2, 3, 6, 8 и 12 месяцев после ложной операции и бульбэктомии. Цитратный раствор крови центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения барабана 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. В плазме крови определяли содержание глутатиона методом, описанным в нашей работе [20]. Осажденные эритроциты отмывали охлажденным физиологическим раствором 2–3 раза. В качестве исследуемых образцов использовали 5%-ную взвесь эритроцитов в *трис*-HCl-буфере. Текучесть липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зондов использовали стабильные нитроксильные радикалы [21] 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро-ү-карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН.

В работе было показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое (глубина – 2–4 Å) липидных компонент мембраны, а зонд II – в липидах, прилегающих к белкам (глубина – 2–4 Å), что позволяет по поведению зондов I и II в мембране судить о липидно-белковых отношениях в них. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I "липидным", а зонд II – "белковым". Зонды вводили в пробы в концентрации 10⁻⁴ М и инкубировали в течение 30–40 мин [22]. Каждое измерение повторялось 3–5 раз. Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности (τ_c), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле, $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \Delta H_+[(I_+/I_-)^{0.5} - 1]$, приведенной в работе [23]. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER200D-SRC компании Brucker (Germany).

Статистическая обработка данных осуществлялась методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel, Origin 6.1 и SigmaPlot 10 при статистической надежности 95% (P < 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее удобным материалом для длительной во времени диагностики при заболевании является кровь. Поэтому, с одной стороны, были изучены изменения структурных характеристик мембран эритроцитов, а с другой – изменение содержания сульфгидрильных и дисульфидных групп в плазме крови БЭ-мышей при развитии патологического процесса, имитирующего деменцию Альцгеймеровского типа, в сравнении с ложнооперированныи и контрольными (до операции) животными на разных стадиях заболевания: от двух недель до 1, 3, 6, 8 и 12 месяцев после операции.

На рис. 1 представлены изменения микровязкости липидной фазы и прибелковых областей мембран эритроцитов у ложнооперированных и бульбэктомированных животных в разные сроки после операции. Наблюдается плавный рост микровязкости липидных областей мембран у ЛОживотных в первые 2 мес после операции. Время корреляции вращательной подвижности, т, характеризующее микровязкость компонентов мембраны, увеличивается в период от 1 до 2 мес практически в 3 раза. Через 2 мес микровязкость липидных областей мембран у ЛО-животных начинает снижаться. Однако к сроку 12 мес после операции микровязкость липидной фазы у ЛО-мышей в 1.7 раза выше, чем у животных до операции – контроль (рис. 1*a*).

В то же время у БЭ-животных текучесть липидной фазы мембран в ранний период после операции (до 1 мес) не изменяется. Индукционный период сохраняется на уровне показателей контрольных животных. После идукционного периода текучесть липидной фазы мембран у БЭживотных максимально (резко) возрастает к двум месяцам. Но уже через 2 мес после операции микровязкость липидных областей мембран у БЭ-животных резко снижается. Время вращательной корреляции у БЭ- и ЛО-мышей от 3 до 12 мес после операции соответственно в 1.5 и 1.7 раз выше, чем у контрольных животных (рис. 1*a*).



Рис. 1. Изменение микровязкости липидной фазы (*a*) и прибелковых областей (*б*) мембран эритроцитов у мышей линии NMR1 до (0 дней) и после операции (1 – ЛО-животные, 2 – БЭ-животные) в зависимости от времени.

В прибелковых областях через две недели после операции микровязкость мембран у ЛО-животных снижается от 1.0 до $0.8 \cdot 10^{-10}$ с и сохраняется на этом уровне в течение 3 мес после операции. Несмотря на незначительное увеличение микровязкости в прибелковых областях в период от 6 до 8 мес, через 12 мес микровязкость у ЛО-животных снижается до показателей, обнаруженных у мышей через 3 мес после операции. Изменение микровязкости прибелковых областей мембран эритроцитов БЭ-животных носит похожий характер. Однако у БЭ-мышей в период от 1 до 2 мес после операции значения микровязкости мембран в прибелковых областях достоверно ниже, чем у ложнооперированных в этот же период. К срокам 6 и 8 мес после операции микровязкость в прибелковых областях соответственно у ЛО- и БЭ-животных возвращается к первоначальному значению (до нормы), а затем к сроку 12 мес после операции она снова снижается до значений приблизительно в 2 раза ниже, чем у контрольных животных

(рис. 16). Таким образом, текучесть как прибелковых, так и липидных областей мембран эритроцитов у БЭ-животных выше, чем у ЛО-животных практически во все сроки после операции.

Экспериментальные данные по изменению статуса глутатиона в плазме крови мышей до и после операции в сроки от двух недель до 12 месяцев представлены на рис. 2. Обнаружено, что в разные периоды развития заболевания изменение содержания восстановленного и окисленного глутатиона в плазме крови мышей контрольной группы, ложнооперированных и опытной группы после бульбэктомии выражены в разной степени. У БЭ-мышей в ранние сроки после операции (0.5 и 1 мес) уровень GSH в плазме крови превышает контрольные значения в 1.5 и 1.4 раза соответственно. Однако с постепенным прогрессированем заболевания (от 2 до 8 мес) содержание глутатиона снижается. Несмотря на достоверное повышение содержания восстановленного глутатиона в ранние сроки (до 1 мес), между уровнем GSH в плазме крови и инициацией нейродегенеративного процесса у БЭ-мышей в период от 0.5 до 12 мес наблюдается отрицательная корреляционная зависимость (r = -0.55, n = 8, P < 0.05). С развитием патологического процесса, моделирующего нейродегенерацию с применением удаления обонятельных луковиц у животных, наблюдается достоверное снижение содержания GSH в плазме крови (рис. 2*a*).

У ЛО-животных через 0.5 и 1 мес после операции уровень GSH в плазме снижается, однако к двум месяцам наблюдается незначительное повышение относительно контрольных значений. В сроки от 3 до 12 мес после ложной операции уровень GSH в плазме крови сохраняется и соответствует контрольному. Несмотря на окислительный стресс, вызванный ложной операцией, достоверные изменения уровня GSH в плазме крови мышей в зависимости от сроков операции отсутствуют (рис. 2*a*).

Практически в одни и те же сроки после операции у ЛО- и БЭ-животных наблюдается однонаправленное изменение содержания окисленного глутатиона в плазме крови. В период от двух недель до трех месяцев у животных уровень GSSG в плазме повышается. Наиболее выраженное его увеличение в плазме наблюдается у ЛО-животных к третьему месяцу по сравнению с БЭ-животными.

Через 6 мес после операции содержание глутатиона в плазме крови снижается, и этот уровень сохраняется до 12 мес. Не смотря на снижение уровня GSSG в плазме крови у животных в период от 6 до 12 мес после опрации, его содержание в эти сроки остается достоверно выше, чем до операции. Необходимо отметить, что уровень изменений содержания GSSG в плазме у БЭ-животных в ранние и поздние сроки развития нейродегенеративного процесса в 2 раза меньше, чем у ложнооперированных (рис. 2*б*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В Институте биофизики клетки РАН (Пущино) Н.В. Бобковой с сотр. разработана наиболее адекватная из существующих в настоящее время модель спорадической формы БА. Для инициации нейродегенеративного процесса используется удаление обонятельных луковиц. Авторы отмечают, что срок в 2 недели – начальная стадия болезни, срок в 1 мес соответствует максимальному проявлению патологического процесса по соответствующим физиологическим и морфологическим показателям. Срок в 5 мес после бульбэктомии соответствует стадии компенсации, когда эти показатели возвращаются к нормальному уровню. В дальнейшем с увеличением возраста животных снова проявляются признаки, сходные с признаками БА [1, 2].

Изменения при болезни Альцгеймера объясняют массивным и прогрессивным разрушением нервных клеток, вызванным различными неврологическими процессами. Теория окислительного стресса объясняет гибель нейронов, вызванную свободными радикалами, которые изменяют состав липидов жирных кислот, мембранную текучесть и проницаемость, нарушая транспортные функции. Одним из побочных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид. В структурном плане МДА – высокотоксичное органическое соединение, участвующее в широком разнообразии биохимических реакций окисления. Гидроперекиси липидов являются промежуточными продуктами перекисного окисления липидов и могут вступать в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами мембран, нарушая их структуру [7, 24-26].

На начальной стадии болезни у БЭ-животных в первую очередь происходит изменение структурного состояния прибелковых областей мембраны, которое связано с функционированием мембранных белков. В прибелковых областях сразу после операции микровязкость мембран у БЭ-животных снижается (увеличивается текучесть) практически в 2 раза в сроки максимального проявления болезни (1-2-3 месяца). Вслед за изменениями в прибелковых областях у БЭ-животных наблюдаются увеличение микровязкости и уменьшение текучести липидного бислоя мембраны через 2 мес после операции (рис. 1). Практически в эти же сроки после операции (1-2-3 мес) происходит увеличение содержания окисленного глутатиона в плазме крови у БЭ-животных. Однако содержание восстановленного глутатиона повышается на более ранних сроках, а именно через 2 недели после операции — начальная стадия болезни (рис. $2a, \delta$).



Рис. 2. Изменение содержания GSH (*a*) и GSSG (*b*) в плазме крови мышей линии NMMR1 до (0 дней) и после операции (1 - ЛО-животные; 2 - БЭ-животные; 3 - ЛО-животные, коэффициент корреляции r = 0.03; 4 - БЭ-животные, коэффициент корреляции r = -0.55, n = 8, P < 0.05) в зависимости от времени. Тонкая сплошная линия на рис. 26 – аппроксимация зависимости для БЭ-животных. Различия между группами считали статистически значимыми (*) в сравнении с контрольной группой при $P \le 0.05$.

Изменение тиолдисульфидного статуса в плазме крови происходит параллельно с изменениями микровязкости в прибелковых областях мембран эритроцитов у БЭ-животных. В период от 0.5 до 3 мес после бульбэктомии снижаются микровязкость мембран эритроцитов (рис. 1*б*) и величина тиолдисульфидного отношения (ТДО) в плазме крови животных (рис. 3).

Изучение статуса ТДО в плазме крови мышей при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа (булбэктомия), показало, что вариабельнось ТДО у БЭ-мышей значительно ниже,



Рис. 3. Изменение ТДО в плазме крови мышей линии NMMR1 до (0 дней) и после операции (1 - ЛО-животные, 2 - БЭ-животные) в зависимости от времени. Различия между группами считали статистически значимыми (*) в сравнении с контрольной группой при $P \le 0.05$.

чем у ложнооперированных. Кроме того, у БЭживотных происходит снижение ТДО в период от 2 недель до 12 мес после операции, а у ЛО-мышей этот показатель снижается в период от 2 до 3 недель, а на стадии компенсации (3–6 мес) он повышается, но не достигает контрольных значений.

На модели трансгенных мышей с двойной мутацией альцгеймеровского и дикого типов исследовали количественнино и сравнивали уровни GSH и GSSG, а также смешанных дисульфидов с белком (Pr-SSG) как в тканях мозга, так и образцах крови на разных стадиях заболевания (1, 5 и 11 мес). У трансгенных мышей обнаружено значительное снижение уровней GSH в тканях головного мозга и связанное с этим снижение ТДО во всех областях головного мозга через 5 мес после операции (непосредственно перед отложением βА) и до 11 мес. В крови уровень GSH увеличивался в период от 1 до 5 мес. Увеличение уровня Pr-SSG в крови через 5 мес в сочетании с падением GSSG и Pr-SSG в мозге авторы объясняют ростом экспорта GSSG из мозга в кровь в период повышения содержания β-амилоида. Сверхпродукцию S-глутатионилированных белков (Pr-SSG) в крови связывают с последующим увеличением системного окислительного стресса, в последствии приводящего к клеточной гибели [16].

Данные, полученные нами на мышах при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа, подтвердились на модели трансгенных мышей при определении окислительно-восстановительного статуса глутатиона в крови.

При анализе уровней МДА в эритроцитах у БЭ-животных видно существенное их увеличение уже через 2 недели (начальная стадия заболевания) после операции по сравнению с контролем. Интересно, что на стадии компенсации (3–6 мес) содержание продуктов ПОЛ снижается, но в сроки максимального проявления болезни – 8–12 мес после операции – значения МДА в 2 раза превышают норму.

У ЛО-животных наблюдается постепенное нарастание уровня МДА, и лишь после срока в 12 мес содержание малонового диальдегида возрастает в 1.6 раз относительно контрольных значений. Уровень МДА в эритроцитах – маркера окислительного стресса у БЭ-мышей возрастает с увеличением послеоперационного срока. По уровню МДА у БЭ-животных наблюдается похожая картина, но при более высоких значениях, что говорит о более высоком уровне ПОЛ в мембранах эритроцитов, чем у ЛО-животных (табл. 1).

Уровень окислительно-восстановительного состояния глутатиона в крови служит показателем окислительного стресса. Данные, полученные нами на животных при двустороннем удалении обонятельных луковиц (бульбэктомия), показали, что в сроки максимального проявления болезни (8—12 мес после операции) с повышением

Объект	Условия	Контроль	Содержание МДА						
			0.5	1	2	3	6	8	12
ЛО	до инкубации	2.1	2.8	3.7	3.5	4.5	3.7	2.5	3.6
	после инкубации	2.8	2.8	4.7	3	5.3	3.3	3.3	4.4
БЭ	до инкубации	1.9	3.8	4.5	4.5	4.8	5.5	2.2	4.2
	после инкубации	2.6	4	9(?)	3.8	3.8	3.3	4.7	4.4

Таблица 1. Содержание МДА (мкмоль/10⁶ клеток) в эритроцитах мышей линии NMMR1 до и в разные сроки (0.5, 1, 2, 3, 6, 8 и 12 мес) после операции

содержания МДА в эритроцитах наблюдается снижение уровня GSH, повышение GSSG в плазме крови и связанное с этими изменениями снижение тиолдисульфидного отношения (рис. 2, рис. 3, табл. 1).

Предполагают, что снижение уровней GSH при БА может быть связано с понижающей регуляцией гомеостаза GSH, а не с ограничением субстрата. Клеточный гомеостаз GSH регулируется неаллостерическим ингибированием обратной связи: GSH влияет на глутамат-цистеинлигазу (GCL), которая отвечает за синтез предшественника GSH – γ -глутамилцистеина (GGC). В условиях, включающих гомеостаз GSH с пониженной регуляцией, GGC служит в качестве субстрата, ограничивающего критические уровни для GSH-синтетазы — основного фермента, ответственного за конденсацию глицина с GGC для образования конечного тиолового трипептида — GSH [27].

Клинические испытания показали повышенный уровень показателей окислительного стресса у пациентов с легкими когнитивными нарушениями, сходными с таковыми у пациентов с деменцией. К этим показателям относятся увеличение уровня МДА и снижение содержания антиоксидантных ферментов, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (GPX). При инактивации последней возможно окислительное повреждение клеточной мембраны. Молекулы мишени, которые могут присутствовать в различных клеточных структурах, такие как клеточные и внутриклеточные мембраны, подвергаются значительным структурным и функциональным изменениям в этой "окислительной атаке", а следовательно, ставят под угрозу клеточную функцию и жизнеспособность [28].

В ходе реакции, катализируемой GSH-пероксидазой, увеличение продукции GSSG может привести к образованию смешанных дисульфидов "белок—глутатион" (глутатионирование белка), что является важным этапом механизма редокс-регуляции в физиологических условиях [29]. Окислительно-восстановительный статус серы играет очень важную роль в регуляции клеточных функций, включая передачу сигналов, рост, выживание и гибель клеток. Обратимая или необратимая модификации остатков цистеина и метионина изменяют функцию белка или стабильность и нарушают внутриклеточный сульфгидрильный гомеостаз. Следовательно, нарушение функции антиоксидантных систем и окислительно-восстановительного статуса серы связано с нарушением функции клетки, старением и многими заболеваниями, в том числе и с болезнью Альцгеймера [30].

Исследования показывают, что нарушение регуляции окислительно-восстановительной сигнализации и сульфгидрильного гомеостаза, вероятно, способствует возникновению/прогрессированию нейродегенерации. Окислительный стресс изменяет тиол-дисульфидный статус ключевых белков, которые регулируют баланс между выживанием и гибелью клеток. При развитии нейродегенеративных заболеваний по типу БА поддерживается теория ранних сбоев в гомеостазе GSH с последующим снижением его уровня с увеличением возраста животных. Полагают, что недостаточная способность синтезировать GSH является уязвимым фактором для БА [31].

Наиболее вероятным объяснением ранних событий, происходящих у животных при развитии экспериментальной патологии, является непродолжительное парадоксальное увеличение уровня глутатиона. Когда редокс-система становится нерегулируемой, появляется дисбаланс, при котором антиоксидантная защита превосходит образование окислителей. Это связывают с редуктивным стрессом, характеризующимся аномально высоким уровнем восстановительных компонентов внутри биологических систем [32].

Редуктивный стресс обнаружили и у животных с экспериментальной патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера, когда их редокс-статус определяли в молодом возрасте, т.е. до начала процесса заболевания. Редуктивный стресс связывают с нарушением гомеостаза глутатиона (увеличение уровня GSH и ТДО) и увеличением агрегации белков в экспериментах на мышах [33].

У индивидов со слабовыраженными когнитивными нарушениями до заболевания, но с высоким риском развития болезни Альцгеймера (носители аллеля АроЕ4), длительное время подвергавшихся редуктивному стрессу, повышена экспрессия фермента глутатионпероксидазы, катализирующего восстановление GSSG [34, 35]. Продолжающийся в течение длительного времени редуктивный стресс может привести к изменению другого, самого отдаленного редокс-баланса, т.е. к окислительному стрессу, индуцируя сигнальные нарушения в клетках. В то время как окислительный стресс характерен для поздней стадии болезни Альцгеймера, редуктивный стресс происходит на ранних этапах заболевания. В период до проявления болезни редуктивный стресс увеличивает риск дальнейшего развития деменции альцгеймеровского типа [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При развитии патологии, моделирующей нейродегенерацию при удалении обонятельных луковиц, у мышей линии NMRI вследствие окислительного стресса обнаружено увеличение уровня МДА – побочного продукта перекисного окисления липидов, повреждающего клеточные структуры и макромолекулы. Вероятно, из-за этих изменений основные нарушения текучести имели место в прибелковых областях мембран у бульбэктомированных животных. Снижение микровязкости мембран эритроцитов наблюдается в периоды от начальной стадии заболевания и до максимального проявления болезни. В эти же периоды проявления болезни наблюдаются увеличение содержания окисленного глутатиона в плазме крови животных и снижение тиолдисульфидного отношения. Нарушения окислительно-восстановительного состояния тиолдисульфидной системы в плазме крови у БЭ-животных сохраняются с развитием болезни. Фактически концентрации GSH и его окисленной формы — глутатион дисульфида в основном определяют окислительно-восстановительное состояние клетки. Текучесть мембран прибелковых и липидных областей мембран эритроцитов у бульбэктомированных животных выше, чем у ложнооперированных практически во все сроки после операции. Следовательно, изменения структурного состояния мембраны и нарушение регуляции окислительновосстановительного гомеостаза глутатиона у животных можно рассматривать как следствия не только окислительного стресса, характерного для поздней стадии болезни Альцгеймера, но и редуктивного (упрощенного) стресса в период до проявления болезни, который увеличивает риск дальнейшего развития деменции альцгеймеровского типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Нестеров В.В. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131. № 5. С. 507.
- 2. Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Александрова И.Ю. // Психиатрия. 2008. № 4-6. С. 34.
- Porquet D., Andréz-Benito P., Griñán-Ferré C. et al. // Age. 2015. V. 37. P. 9747.
- 4. Lin M.T., Beal M.F. // Nature. 2006. V. 443. P. 787.
- Wilkins H.M., Carl S.M., Weber S.G. et al. // J. Alzheimers Dis. 2015. V. 45. P. 305.

- Riechter C., Gogvadze V., Laffranchi R. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1271. P. 67.
- 7. Владимиров Ю.Ф., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.
- Герасимов Н.Ю., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 7. С. 82.
- 9. Molochkina E.M., Gerasimov N.Yu., Goncharova I.N. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2008. V. 143. P. 94.
- Floyd R.A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999. V. 222. P. 236.
- 11. Ziegler D.M. // Annu. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 305.
- McBean G.J., Aslan M., Driffiths R.G., Torrã R.C. // Redox Biology. 2015. V. 5. P. 186.
- 13. Sing R.P., Shashvsat S., Kapur S. // J. Indian Acad. Clinical Med. 2004. V. 5. P. 218.
- 14. *Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. //* Clin. Chim. Acta. 2003. V. 333. № 1. P. 19.
- 15. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. // Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2007. V. 39. P. 44.
- 16. *Zhang C., Rodriguez C., Spaulding J.* // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 28. № 3. P. 655.
- Marí M., Collel A., Morales A., Montfort C. // Antioxid. Redox Signal. 2010. V. 12 P. 1294.
- 18. *Marí M., Morales A., Collel A.* // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1830. № 5. P. 3317.
- 19. *Bomhard E., Mohr U.* // Exp. Pathol. 1989. V. 36. № 3. P. 129.
- 20. Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б. // Изв. АН. Сер. биол. 2005. № 1. С. 9.
- 21. *Карпова С.Г., Милюшкина Э.Г., Люсова Л.Р. и др. //* Хим. физика. 2018. Т. 37. № 3. С. 40.
- 22. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. и др. // Биохимия. 1971. Т. 36. № 6. С. 1149.
- Вассерман А.М., Бучаченко А.Л, Коварский А.Л., Нейман И.Б. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1968. Т. 10. С. 1930.
- 24. Pradhan D., Weiser M., Lumley-Sapanski K. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1023. P. 398.
- Negre-Salaure A., Auge N., Auala V. et al. // Free Radical. Res. 2010. V. 44. P. 1125.
- 26. Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M. // J. Proteomics. 2013. V. 92. P. 239.
- 27. Braidy N., Zarka M., Welch J., Bridge W. // Curr. Alzheimer Res. 2015. V. 12. № 4. P. 298
- 28. *Padurariu M., Ciobica A., Hriten L. et al.* // Neurosci. Lett. 2010. V. 469. P. 6.
- Ghezzi P. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830.
 № 5. P. 3265.
- Liedhegner E.A.S., Gao Xing-Huang, Mieyal J.J. // Redox. Signal. 2012. V. 16. № 6. P. 543.
- 31. *Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S. et al.* // Biol. Chem. 2009. V. 390. P. 191.
- 32. *Kemp M., Go Y.M., Jones D.P.* // Free Radical Biol. Med. 2008. V. 44. P. 921.
- 33. *Zhang X., Min X., Li C., Benjamin L.J. et al.* // Hypertension. 2010. V. 55. № 6. P. 1412.
- 34. *Badía M.-C., Giraldo E., Dasí F. et al.* // Free Radical Biol. Med. 2013. V. 63. P. 274.
- 35. Lloret A., Fuchsberger T., Giraldo E., Vina J. // Curr. Alzheimer Res. 2016. V. 13. P. 1.

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА том 40 № 2 2021